

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



**DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE
E PATOLOGIA DELL'INVECCHIAMENTO CEREBRALE**

XVIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

**INDAGINI GENETICHE SULLE IPOACUSIE
NON SINDROMICHE**

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. Lucio Annunziato

CANDIDATO:

Dr. Michele Cavaliere

TUTORE:

Ch.mo Prof. Elio Marciano

Anno Accademico 2005/2006

Introduzione

L'ipoacusia insorta in epoca preverbale rappresenta una delle patologie più frequenti, interessando circa 1/1000 bambini nei paesi più sviluppati.

L'etiopatogenesi di circa il 60% di queste forme di perdita della capacità uditiva è attribuita attualmente a cause genetiche ^(1,2,3); esse vengono distinte in:

1. Forme sindromiche (30% dei casi) in cui oltre alla sordità vi sono segni e sintomi a carico di altri apparati quali ad esempio endocrino, oculare, renale, cardiaco (Sindrome di Usher, di Alport, di Pendred, etc.).

2. Forme non sindromiche (70% dei casi): in cui l'ipoacusia non risulta legata ad altre patologie.

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nell'identificazione dei geni coinvolti nelle ipoacusie, ma resta ancora molto da fare per quanto riguarda non solo l'identificazione dei geni responsabili dell'ipoacusia ma anche i meccanismi molecolari alla base di questa patologia.

Si ritiene che più di un centinaio di geni possono essere coinvolti nelle forme ereditarie non sindromiche: molti di essi non sono stati ancora identificati.

Da un punto di vista nosografico le ipoacusie a carattere genetico si distinguono in base alle modalità di trasmissione in:

- *Autosomica recessiva: (80-85% dei casi)*

Le mutazioni a carico del gene GJB2 che codifica per la connessina 26 sono ritenute responsabili di più del 50% di queste forme di sordità, almeno a livello del bacino del Mediterraneo ⁽⁴⁾. Le percentuali nel resto del mondo sono varie: 30% nel Nord Europa, 40% negli Stati Uniti, 22% in Brasile, 25% in Estremo Oriente, 17% in Ghana e 15% in Australia ⁽⁵⁾.

Il locus contenente il gene GJB2 è localizzato sul cromosoma 13 ⁽⁶⁾. La prima mutazione scoperta a carico di tale gene fu individuata per in famiglie consanguinee della Tunisia ⁽⁷⁾ ma un importante contributo fu dato, in seguito, da studi effettuati in 19 famiglie caucasiche ⁽⁸⁾.

Le connessine sono una famiglia di proteine di membrana largamente espresse nell'organismo umano (finora ne sono stati identificati più 20 tipi diversi); ogni connessina è costituita da quattro domini transmembrana con due loops extracellulari ed uno

citoplasmatico e si combina in esameri formare un complesso che viene definito connessone (fig. 1); ogni connessone, a sua volta, interagisce con un altro connessone di una cellula adiacente per formare canali intercellulari o gap junctions: tali strutture sono molto importanti per gli scambi di elettroliti, secondi messaggeri e metaboliti ^{3,9}.

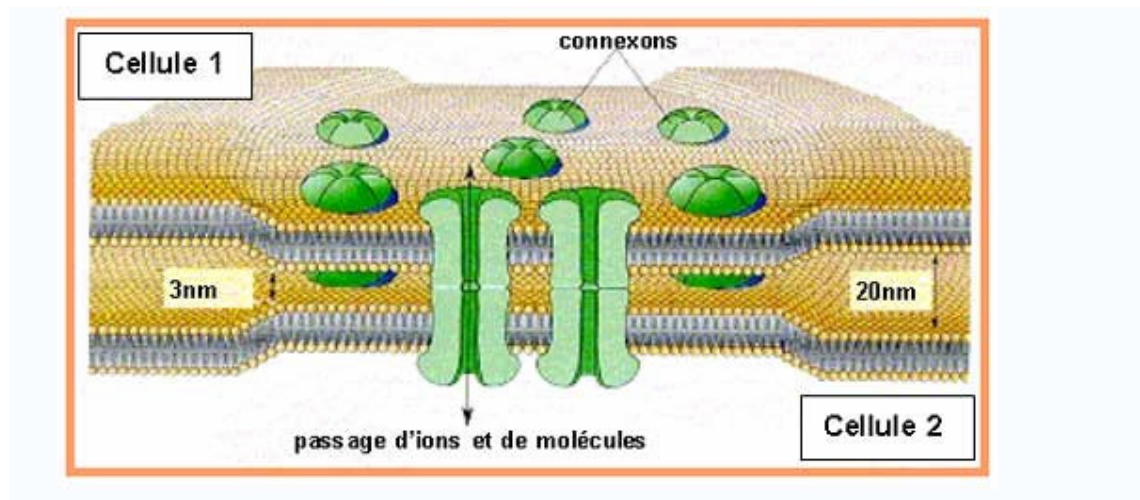


Fig. 1. Struttura di una gap junction

Grazie a studi effettuati nell'epitelio sensoriale dell'orecchio interno di rettili, volatili e mammiferi è stato possibile accertare e individuare i diversi tipi di connessina che costituiscono le "gap junctions" delle cellule sensoriali dell'orecchio interno dei mammiferi. Da questi studi è emerso che nella coclea dei mammiferi sono presenti quattro isotipi (cx 26, cx30, cx31, cx43) mentre nell'organo vestibolare ne sono presenti tre (cx26, cx30, cx43). La cx26 e la cx30 sono state trovate nella regione basale della stria vascolare, nelle cellule del lembo spirale e nelle cellule di sostegno dell'organo del Corti (Fig. 2).

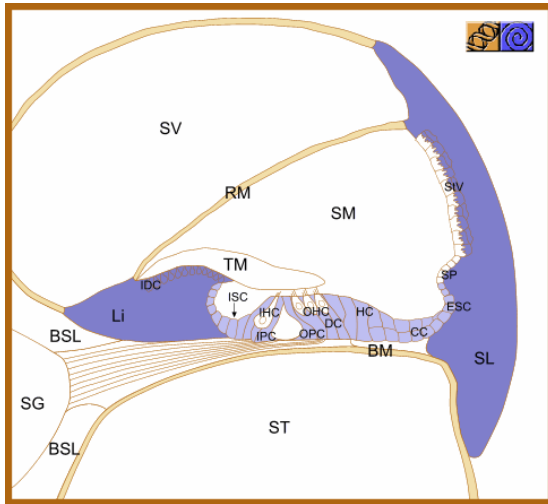


Fig. 2- Sezione della coclea: in viola zone di espressione di cx26 e cx30

La cx31 è collocata nelle cellule situate a livello della prominenza spirale, una regione dove la cx30 non è espressa e la percentuale di cx26 è molto bassa (Fig. 3).

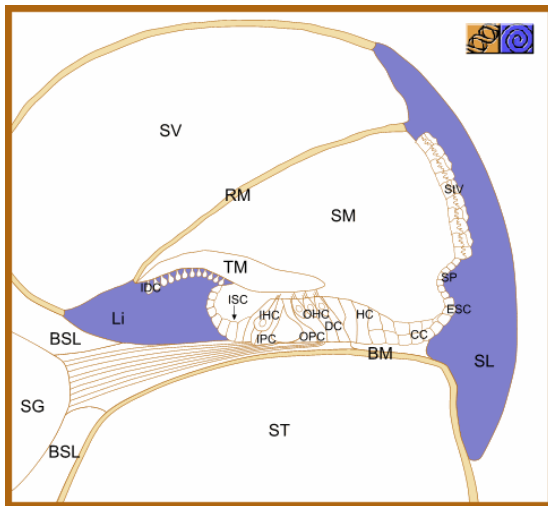


Figura 3- Sezione della coclea: in viola zone di espressione di cx31

La cx43 è stata individuata solo in alcuni tipi di fibrociti ⁽¹⁰⁾.

La mutazione più comune nella connessina 26 è la delezione in posizione 35 di una singola guanina da una sequenza di sei guanine (35delG); questa mutazione causa un

premature stop della sintesi della proteina ⁽⁵⁾. Oltre alla 35delG, che è la più frequente, sono state riscontrate anche altre mutazioni poco comuni come la 167delT e la 235delC ⁽⁴⁾.

Clinicamente l'ipoacusia associata alla mutazione 35delG è ad insorgenza preverbale, è neurosensoriale e non è progressiva ⁽¹¹⁾.

Mutazioni nella cx 26 possono anche essere, in rari casi, cause di sordità autosomiche dominanti: Sono state individuate nove mutazioni responsabili di sordità dominanti tra cui: M34T, W44C, W44S, R75W, D66H ^(5,12).

Anche se la maggior parte delle sordità ereditarie è imputata ad una mutazione del gene GJB2 in una condizione di omozigosi, sono stati trovati casi in cui non erano presenti mutazioni della cx26 o si presentava una condizione di eterozigosi quindi la mutazione di un solo allele. Studi su questi casi hanno suggerito la presenza di altri geni coinvolti nella sordità e collocati sullo stesso punto nel cromosoma. Questa ipotesi è stata confermata dal ritrovamento di due delezioni che non riguardano il gene GJB2 ma interessano il gene GJB6 che codifica per la connessina 30, localizzato nello stesso locus di GJB2. Queste delezioni chiamate del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854), sono state trovate in soggetti omozigoti o in doppia eterozigoti con la mutazione di GJB2 ^(13,14).

Studi hanno dimostrato che la prima delezione (del(GJB6-D13S1830)), è molto frequente in Spagna, Francia, Inghilterra, Israele e Brasile, è meno frequente negli USA, Belgio e Australia e molto rara nel Sud Italia ⁽¹⁵⁾. La seconda delezione, identificata più recentemente, anch'essa molto frequente in Spagna, è stata identificata solo nel Nord Italia.

Inoltre è stato riscontrato che mutazioni di GJB6 possono essere responsabili di sordità autosomiche dominanti ⁽¹⁶⁾.

Anche altre mutazioni nei geni che codificano per le restanti connesine presenti in percentuali minori nell'orecchio interno possono essere coinvolte nei disturbi uditivi e causare sordità dominanti, recessive o partecipare nelle forme sindromiche. I geni interessati sono: GJB1 che codifica per la connessina 32, una mutazione in questo gene può causare la forma X-linked Charcot-Marie-Tooth di tipo 1 ⁽¹⁷⁾; GJB3 che codifica per la connessina 31: una mutazione in questo gene può portare sia sordità che disturbi cutanei ⁽¹⁸⁾, a seconda di dove è collocata la mutazione.

- Autosomica dominante: (10-15%)

Attualmente molto interesse in letteratura è rivolto verso il locus della regione q13-q14 del cromosoma 11 (fig. 4), che codifica per la miosina non convenzionale VIIA, uno dei membri di una vasta famiglia di proteine motrici che si muovono lungo i filamenti citoplasmatici di actina.

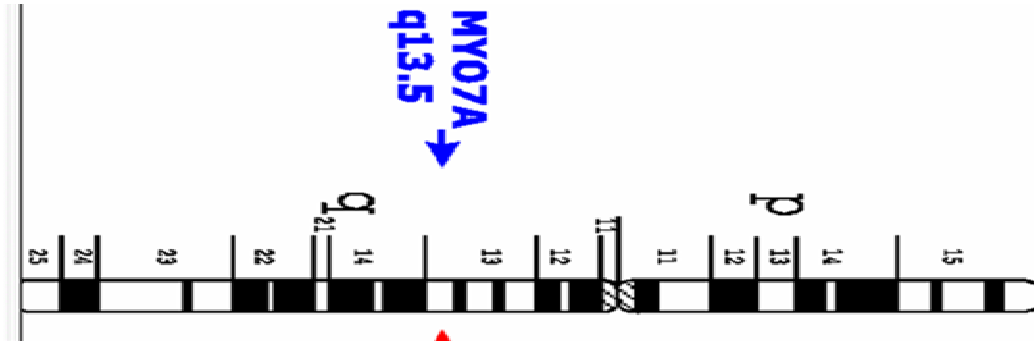


Fig. 4 – Locus della myosina VIIA

Il gene della miosina VIIA è composto da 49 esoni (compreso il primo esone non tradotto) con un trascritto principale (mRNA) di 7643 coppie di basi. Il codone di inizio (ATG) è localizzato nel secondo esone (in posizione 273) mentre il codone di stop (TGA) è localizzato nell'esone 49 (fig. 5).

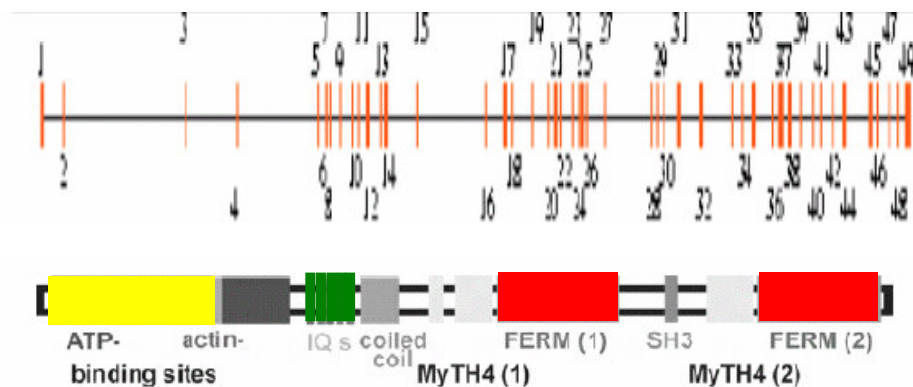


Fig. 5 – Struttura del gene della myosina VIIA

Mutazioni a carico di questo gene possono essere implicate anche in alcune forme sindromiche ereditate in maniera autosomica recessiva come la sindrome di Usher 1B ^(19,20), e la sua variante atipica ^(21,22), ma soprattutto in forme distinte di sordità, ereditate, invece, in maniera autosomica dominante (DFNA11) ^(21,23,24).

In particolare Liu et al. ⁽²¹⁾ hanno riscontrato una delezione di nove coppie di basi nell'esone 22, responsabile della creazione di dimeri aberranti non funzionali; Bolz et al. ⁽²³⁾ hanno individuato una mutazione dissenso a livello dell'esone 21 capace di modificare un sito della proteina legante la calmodulina; Lijendijk et al. ⁽²⁴⁾ hanno, invece, ravvisato una mutazione dissenso nell'esone 13 capace di determinare una sostituzione di Asn con Ile. Grazie ad un modello molecolare costruito dagli autori si è realizzato che tale mutazione cade nel dominio della testa della proteina, proprio nel sito responsabile dell'idrolisi dell'ATP.

- *X linked: (3%)*

si esprime solo nei maschi quando il gene è recessivo come avviene per il gene POU3F54 codifica per un fattore trascrizionale che controlla lo sviluppo embrionale e la differenziazione cellulare dell'orecchio interno.

- *Mitochondriali: (1%).*

Trattandosi di mutazioni che vanno ad incidere sul corretto funzionamento dei mitocondri, praticamente ubiquitari nell'organismo, danno vita per lo più di forme sindromiche, in cui, chiaramente, vengono maggiormente colpiti i tessuti a più alto fabbisogno di ATP. Tra queste sindromi ricordiamo:

- MELAS – mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes ^(25,26)

Sintomi: ictus, miopatia mitocondriale, acidosi lattica sordità;

- MERFF – myoclonic epilepsy with ragged red fibers ⁽²⁷⁾

Sintomi: miocloni epilessia, atassia, deterioramento cognitivo, atrofia ottica, sordità;

- KSS - sindrome di Kearn Sayre ^(28,29)

Sintomi: oftalmoplegia progressiva, alterazioni della pigmentazione retinica, disturbi del ritmo cardiaco, disfunzioni cerebellari, crisi comiziali, deterioramento cognitivo.

- Diabete mellito associato a sordità ⁽³⁰⁾.

Esistono, tuttavia, anche delle forme non sindromiche, che interessano cioè esclusivamente la coclea: in tali forme si riscontrano mutazioni a carico generalmente di due geni del DNA mitocondriale (mtDNA):

- gene 12SrRNA

Tale gene codifica per la subunità 12S del rRNA mitocondriale: una riduzione in termini quantitativi di tale rRNA comporta un decremento delle capacità di sintesi proteica, andando ad incidere in particolar modo sui complessi I,III e IV della catena respiratoria e, quindi, sulla sintesi di ATP ^(31,32).

Una alterazione in termini qualitativi potrebbe invece creare dei siti di interazione con antibiotici aminoglicosidici con conseguente effetto tossico simile a quello sfruttato contro i batteri.

Le mutazioni più frequenti a carico di 12SrRNA sono rappresentate da:

- A1555G ⁽³³⁾;
- 961delTCn ⁽³⁴⁾;
- T1391C ⁽³⁵⁾.

- Gene tRNA(ser)

Tale gene codifica per il tRNA della serina. Le mutazioni influiscono, tuttavia, sul processing del precursore del tRNA(ser) comportando, quindi, non un'alterazione qualitativa ma una diminuzione del 60-70% dei livelli di tale RNA transfer ⁽³⁶⁾.

Tale decremento comporta la conseguente diminuzione complessiva della sintesi proteica mitocondriale ed accumulo di polipeptidi anomali o di proteine incomplete a livello endocellulare, con effetto tossico per le cellule stesse ⁽³⁷⁾.

Le mutazioni più frequenti a carico di tale gene sono rappresentate da:

- A7445G ⁽³⁸⁾;
- 7472inC ⁽³⁹⁾;
- T7510C e T 7511C ⁽⁴⁰⁾.

Scopi della ricerca

- 1) eseguire un attento screening audiologico-genetico delle ipoacusie, in particolare delle forme non sindromiche che oltre ad essere quelle più frequenti, pongono le maggiori difficoltà diagnostico-etologiche non manifestando altri segni e sintomi extrauditivi. In particolare si è cercato di stabilire la prevalenza delle principali mutazioni genetiche coinvolte nella patogenesi della ipoacusia nell'ambito della popolazione presa in esame. Nello stesso tempo, in particolari casi in cui era possibile allargare lo studio ad altri componenti della famiglia, è stato possibile individuare la presenza di alcune mutazioni mai descritte finora;
- 2) allestire una procedura metodologica audiologico-genetica utile nella diagnosi precoce dell'ipoacusia e che possa essere tradotta in una precoce riabilitazione protesica dei soggetti con conseguente recupero dell'udito e delle capacità verbali del bambino;
- 3) approntare uno specifico software dedicato alla elaborazione dei singoli esami audiometrici in modo da cercare di abbinare un particolare genotipo ad una specifica tipologia di ipoacusia: tale correlazione genotipo-fenotipo permette di operare nella pratica clinica un corretto counseling genetico.

Casistica e Metodologia

L'indagine è stata eseguita su soggetti ipoacusici identificati nell'Unità di Audiologia dell'Università Federico II di Napoli, nell'Istituto Smaldone di Napoli e Salerno ed in varie strutture ospedaliere Campane in base alle seguenti caratteristiche:

- età compresa tra 2 mesi e 56 anni;
- ipoacusia congenita o postverbale insorta prima dei 40 anni di età
- almeno 25 dB di perdita nell'orecchio migliore (l'orecchio migliore è stato valutato con la media dei valori delle frequenze 500, 1000, 2000, 4000). Per le misure fuori scala è stato inserito il valore di 125 db.

I criteri di esclusione erano rappresentati da:

- prematurità, basso peso e sofferenza ipossica alla nascita, iperbilirubinemia, traumi cranici;
- infezioni batteriche o virali contratte durante la gravidanza o postatali,
- assunzione di farmaci ototossici;
- esposizione a traumi acustici;
- forme sindromiche.

Sono stati selezionati 191 pazienti affetti da ipoacusia neurosensoriale bilaterale; tali soggetti sono tutti di origine Campana tranne 5 che sono di origine non Campana e 3 adottati, su cui quindi non si hanno notizie familiari.

In una prima fase è stata effettuata un'attenta analisi anamnestica dei soggetti selezionati, in modo da poter individuare eventuali altri familiari con una significativa perdita uditiva, compilare un albero genealogico il più dettagliato possibile ed escludere forme sindromiche ed ipoacusie dovute a cause diverse da quelle genetiche. In tal modo è stato possibile avere informazioni sul tipo di trasmissione della patologia nella famiglia in esame per individuare per esempio forme recessive, dominanti o sporadiche.

Tutti i soggetti inclusi nello studio, i genitori ed alcuni parenti prossimi sono stati poi sottoposti ad una attenta valutazione audiologica che ha previsto l'effettuazione di diversi esami strumentali:

- Esame audiometrico tonale standard e automatico: per la valutazione della soglia uditiva, del tipo di sordità e delle caratteristiche dell'audiogramma.

- Audiometria vocale: per l'esame dell'intelleggibilità delle parole e della comprensione verbale.
- Impedenzometria: studio delle curve timpanometriche e dei riflessi stapediai.
- ABR: valutazione obiettiva della soglia e della conduzione nervosa dello stimolo.
- Indagini sull'apparato vestibolare: ricerca Ny spontaneo, di posizione e di posizionamento, valutazione del VOR, Head Shaking test e potenziali evocati vestibolari.

Per lo studio genetico si è proceduto, previo consenso informato scritto, ad un prelievo di 10 ml di sangue venoso, che sono stati conservati in EDTA, a temperatura ambiente, ed inviati per l'analisi molecolare entro 48 ore al laboratorio di genetica. La seconda fase della ricerca ha infatti previsto l'estrazione del materiale biologico (DNA/RNA) dai campioni di sangue presso l'Istituto Internazionale di Genetica e Biofisica di Napoli, in collaborazione con il Servizio di Genetica Medica dell'Ospedale Casa di Sollievo della Sofferenza di S. Giovanni Rotondo (Fg).

La ricerca delle mutazioni è stata innanzitutto realizzata mediante sequenziamento diretto, analizzando in primo luogo il gene GJB2 (connessina 26). Nei casi in cui veniva identificata una sola mutazione (eterozigosi) si procedeva alla ricerca di mutazioni nel gene GJB6 (connessina 30), e all'eventuale presenza delle due delezioni (del GJB6-D13S1830 e del GJB6-D13S1854) a monte del gene GJB6 recentemente identificate come causa di ipoacusia ⁽¹⁴⁾.

Nel caso di identificazione di mutazioni nuove, prima di attribuire all'alterazione molecolare un significato patologico è stato necessario realizzare le verifiche universalmente note nel campo della ricerca (escludere che non si tratti di un polimorfismo, segregazione con la patologia, saggi per la verifica di funzionalità, etc.).

Per tutti i soggetti in cui non venivano identificate mutazioni nei suddetti geni si è realizzata un'analisi di "linkage" genetico per individuare il locus contenente il gene responsabile della patologia. In tali casi (si tratta di tre famiglie) si è allargata l'indagine ad un numero quanto più vasto di familiari, in modo da ottenere dati precisi circa la sede della mutazione e la sua modalità di trasmissione.

Risultati

Tra i 191 soggetti selezionati e analizzati, sono stati individuati:

- 54 soggetti appartenenti a famiglie con modalità di trasmissione autosomica recessiva;
- 27 soggetti appartenenti a famiglie con modalità autosomica dominante;
- 110 soggetti sporadici.

Sono state analizzati, inoltre, in dettaglio i componenti appartenenti a tre diverse famiglie in cui la mutazione interessava rispettivamente:

- il gene GJB2 (ma veniva ereditata secondo una modalità di trasmissione autosomica dominante),
- il locus nella regione q13-q14 del cromosoma 11, che codifica per la miosina non convenzionale VIIA;
- il gene 12SrRNA, ubicato sul DNA mitocondriale (mtDNA).

I soggetti selezionati sono stati innanzitutto sottoposti ad analisi molecolare per il gene GJB2 che codifica per la connessina 26. Sono stati identificati 24 soggetti omozigoti per la delezione 35delG, di cui 14 soggetti sporadici ed i rimanenti 10 appartenenti al gruppo degli autosomici recessivi. La percentuale di omozigoti nel gruppo dei 191 pazienti risulta quindi di 12.5% (24/191).

Prendendo in considerazione solo i casi sporadici e familiari recessivi (164 soggetti), la percentuale di omozigoti risulta di 14,6%, mentre considerando solo i casi con trasmissione autosomica familiare recessiva (54 soggetti) la percentuale degli omozigoti risulta essere 44%.

Dei 24 soggetti omozigoti identificati, 2 presentano un' ipoacusia di grado moderato con una perdita compresa tra i 41 e i 70 db; 3 presentano un' ipoacusia di grado severo con una perdita compresa tra 71 e 95 db; 19 presentano un'ipoacusia di grado profondo con una perdita superiore a 95 db.

Nessun soggetto presenta ipoacusia di grado lieve (21-40 dB). Il tipo di ipoacusia è congenito e non progressivo: sono tutti soggetti giovani con età inferiore ai 32 anni e non c'è correlazione tra il tipo di perdita uditiva e l'età. (Tab. 1 e Fig. 6).

Omozigoti 35delG

Sigla soggetto	125	250	500	1000	2000	4000	8000
A01		90	100	110	115	125	125
G08	85	90	85	105	105	125	125
A129	45	45	70	80	75	80	90
A10		95	100	115	120	115	125
G19		90	100	105	110	115	125
A18	35	40	45	65	55	55	65
A115		85	90	115	120	125	125
G24	80	100	110	125	125	125	125
A23		45	65	80	80	65	
G26		40	40	65	60	60	
O1		90	105	110	120	110	105
G28		75	90	95	110	125	125
G32		80	90	95	90	75	
A77		80	95	125	125	125	125
A85A	80	90	100	105	115	125	125
G36		75	80	95	125	125	125
O2		90	90	110	110	125	125
A134	85	85	90	100	105	125	125
G41	75	85	85	100	105	100	100
A51				90	90	100	125
G51		95	95	105	105	115	125
G56	70	80	90	100	110	120	125
A65	90	80	95	100	115	115	125
O3	75	85	100	110	125	125	125

Tab. 1. *Perdite uditive dei soggetti omozigoti 35delG*

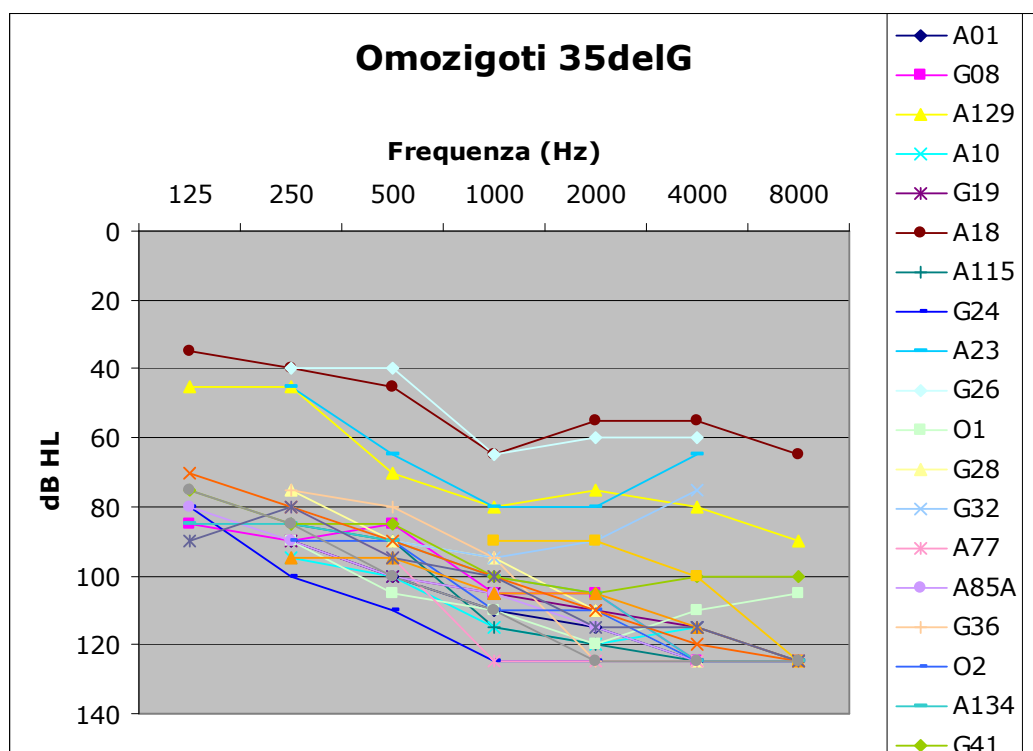


Fig. 6. Curve audiometriche dei soggetti omozigoti 35delG

Tra i soggetti presi in esame 8 individui sono risultati doppi eterozigoti per la 35delG su un allele ed un'altra mutazione nota sull'altro allele, tra cui 2 sporadici e 6 recessivi. (Tab. 2 e Fig. 7). Considerando tutti i soggetti (191) la percentuale di doppi eterozigoti è del 4,1%, considerando solo i casi sporadici e recessivi (164) la percentuale risulta del 4,8%.

Età	Mutazione	Codice soggetto	Perdita uditiva						
			125	250	500	1000	2000	4000	8000
3 anni	35delG/167delT	A17	40	45	60	70	75	65	65
14 anni	35delG/del E120	A79		40	40	50	60	60	
24 anni	35 delG/E47X	A83-1	60	70	70	85	85	75	70
20 anni	35delG/W77R	A125	50	60	75	75	85	65	70
10 anni	35delG/L90P	A25-1		25	35	45	55	80	75
3 anni	35delG/Y65X	A37	65	60	80	80	70	75	85
11 anni	35delG/R127H	A46		60	80	85	85	100	125
39 anni	35delG/G12V	A113	45	60	70	70	70	70	75

Tab. 2. Perdite uditive e mutazioni identificate nei soggetti doppi eterozigoti 35delG/altro.

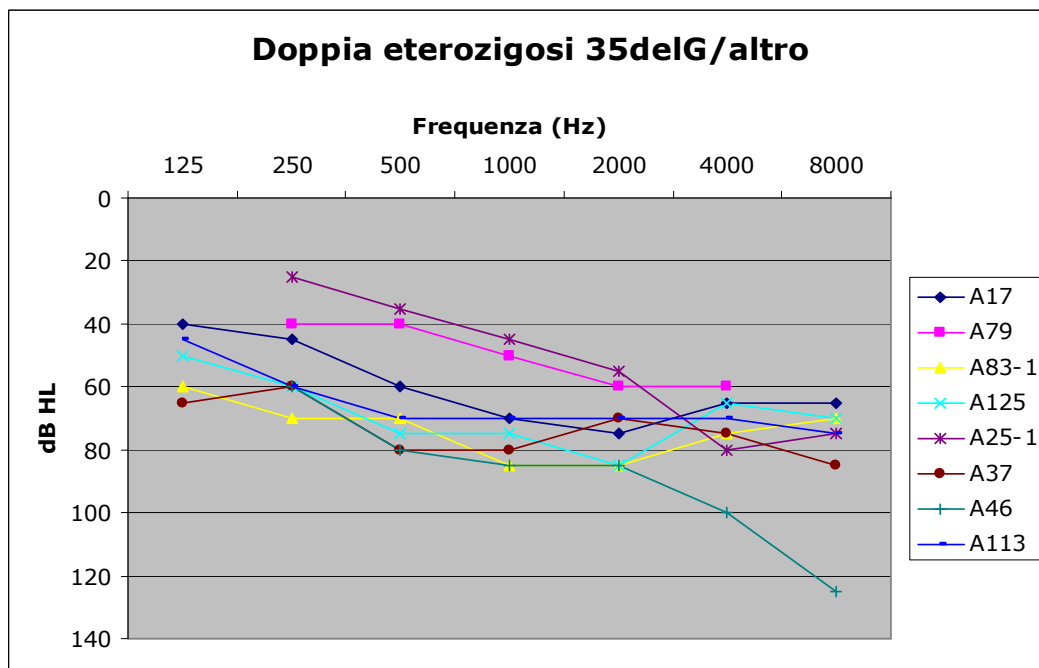


Fig. 7. Curve audiometriche dei soggetti doppi eterozigoti 35delG/altro.

Il soggetto A46 (mutazione R127H), l'unico che presenta un'ipoacusia di tipo profondo è di origine non campana. Tale mutazione non è stata riscontrata in nessun altro soggetto esaminato.

Sono stati individuati 2 soggetti doppi eterozigoti non 35delG tra cui 1 recessivo e 1 sporadico ($2/191=1\%$; $2/164=1,2\%$) (Tab. 3 e Fig. 8).

età	mutazione	Sigla soggetto	Perdita uditiva						
			125	250	500	1000	2000	4000	8000
19 anni	V27I/F83L	A67	40	35	45	90	115	115	125
54 anni	V153I/L90P	A108	25	35	45	55	65	70	85

Tab. 3. Perdite uditive e mutazioni identificate nei soggetti doppi eterozigoti non 35delG.

Le mutazioni V27I ed F83L sono state riscontrate solo nel soggetto A67 anch'esso di origine non campana.

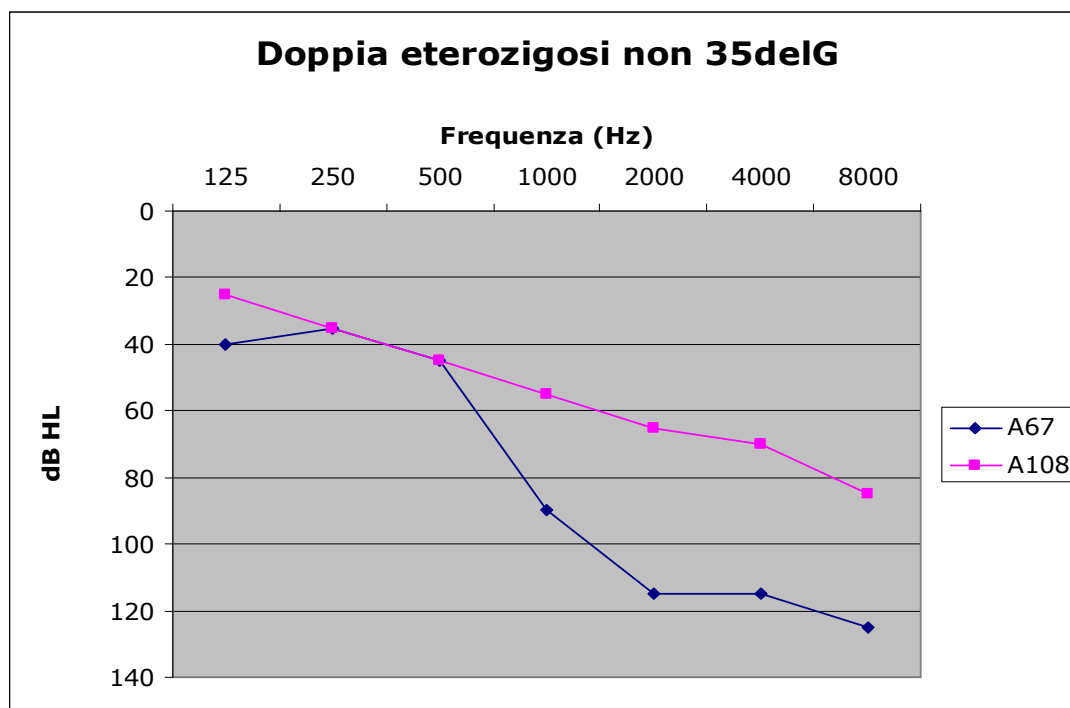


Figura 8. Curve audiometriche dei soggetti doppi eterozigoti non 35delG.

Sono stati individuati 4 soggetti con una singola eterozigosi 35delG, 2 recessivi e 2 sporadici (Tab. 4 e Fig. 9); considerando tutti i soggetti in esame, la percentuale di individui con questa caratteristica è del 3,6%; considerando solo i casi sporadici e recessivi, la percentuale è del 4,2%.

Sigla soggetto	Perdita uditiva						
	125	250	500	1000	2000	4000	8000
G58-II-1	70	75	90	100	105	115	125
A56	80	85	100	105	95	85	80
A71	55	60	65	75	75	75	100
A90		35	50	45	50	55	

Tab. 4. Perdite uditive nei soggetti con singola eterozigosi 35delG.

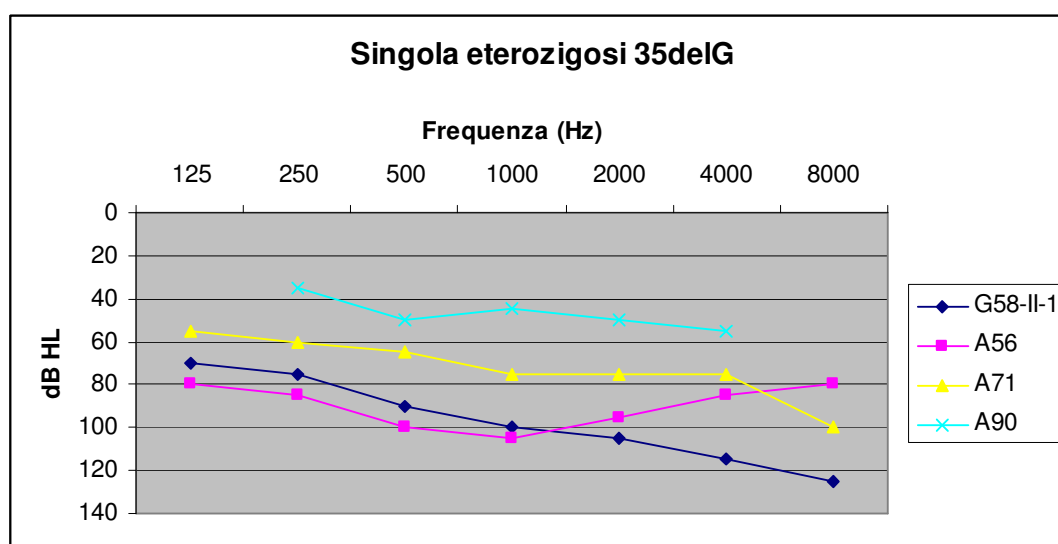


Fig. 9. Curve audiometriche dei soggetti con singola eterozigosi 35delG.

Ancora, tra i 191 soggetti ne sono stati identificati 8 con singola eterozigosi non 35delG tra cui 3 con familiarità recessiva e 5 sporadici ($8/191=4,1\%$; $8/164=4,8\%$) (Tabella 5 e Figura 10).

Mutazione	Sigla soggetto	Perdita uditiva						
		125	250	500	1000	2000	4000	8000
c579delA	A36-C		80	80	85	95	85	
V37I	A26	15	35	45	40	50	75	70
V153I	A54	45	50	60	75	80	75	80
V153I	A97	45	50	60	85	105	115	125
G160S	A130		70	70	80	80	80	
L90P	A138	15	10	25	50	65	60	70
V153I	A139	80	85	85	85	85	70	75
L90P	A140		110	100	110	115	120	125

Tab. 5. Perdite uditive e mutazioni identificate nei soggetti con singola eterozigosi non 35delG.

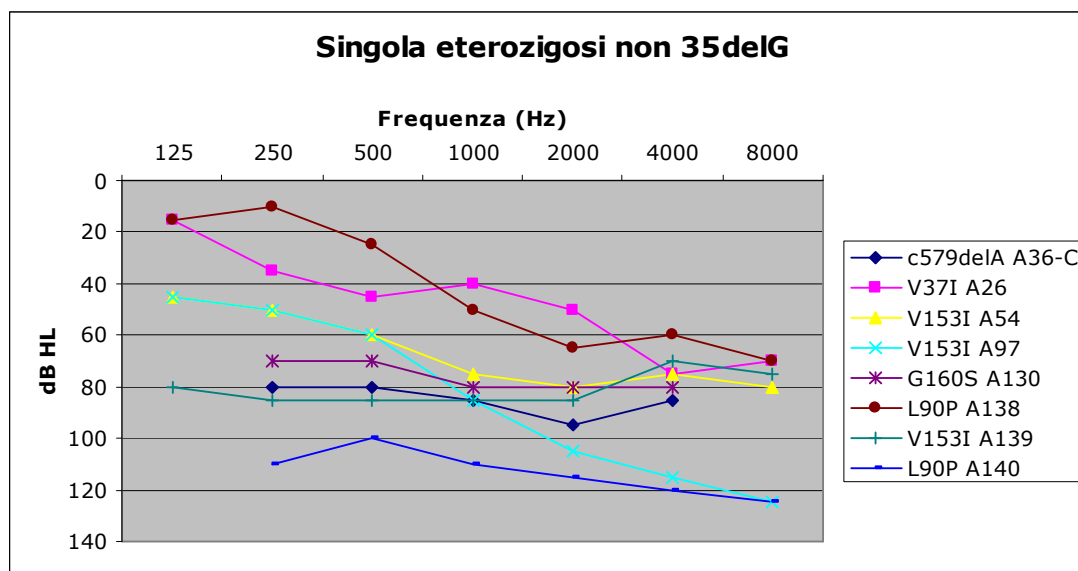


Figura 10. Curve audiometriche dei soggetti con singola eterozigosi non 35delG.

I soggetti con mutazione su un singolo allele sono stati analizzati anche per la ricerca di mutazioni nei geni GJB6 (analizzando la presenza delle due delezioni a monte di tale gene, riportate in letteratura come causative di ipoacusia).

Per tutti i soggetti esaminati non è stata identificata alcuna mutazione nel gene GJB6.

Per i rimanenti soggetti non è stato possibile, al momento, identificare con certezza una causa genetica. Nella Tab. 6 e sono riportati i valori audiometrici di un campione di 22 soggetti sporadici e con trasmissione familiare recessiva.

	Idiopatici Sporadici/Fam. Rec. :gene non identificato						
	125	250	500	1000	2000	4000	8000
G10	55	75	95	90	95	90	65
A04	40	45	60	85	95	95	125
A05		45	40	40	45	65	
A13		90	85	90	105	100	125
A16	25	30	35	50	55	60	70
A20	50	60	80	100	110	100	125
A21	75	105	125	125	125	125	125
A28	25	35	50	50	60	60	
A39	90	95	100	115	120	125	125
A49	80	95	110	125	125	125	125
A64	25	20	30	60	65	70	60
A68	40	60	70	80	110	125	125
A104	25	20	20	20	30	40	
A106	35	35	40	60	70	70	
A118	75	85	90	105	125	125	125
A122	20	25	35	45	45	45	
A124	85	95	105	110	90	90	
A111		90	100	110	115	125	125
A100	25	30	35	60	80	85	
A81	40	40	50	55	55	50	
A78		75	90	95	100		
G23		35	30	45	50	60	
A80		60	65	90			
A127	20	20	20	20	20	65	
A121		35	45	65	65	65	
A103	85	90	95	105	110	105	125
G01	65	80	100	95	100	85	90
G04-1	60	60	80	80	85	75	65
A59	45	50	65	90	75	70	

Tabella 6. *Perdite uditive identificate nei soggetti idiomatici sporadici e familiari recessivi per cui non è stato identificato il gene.*

Nella fig. 11 vengono illustrati i relativi esami audiometrici.

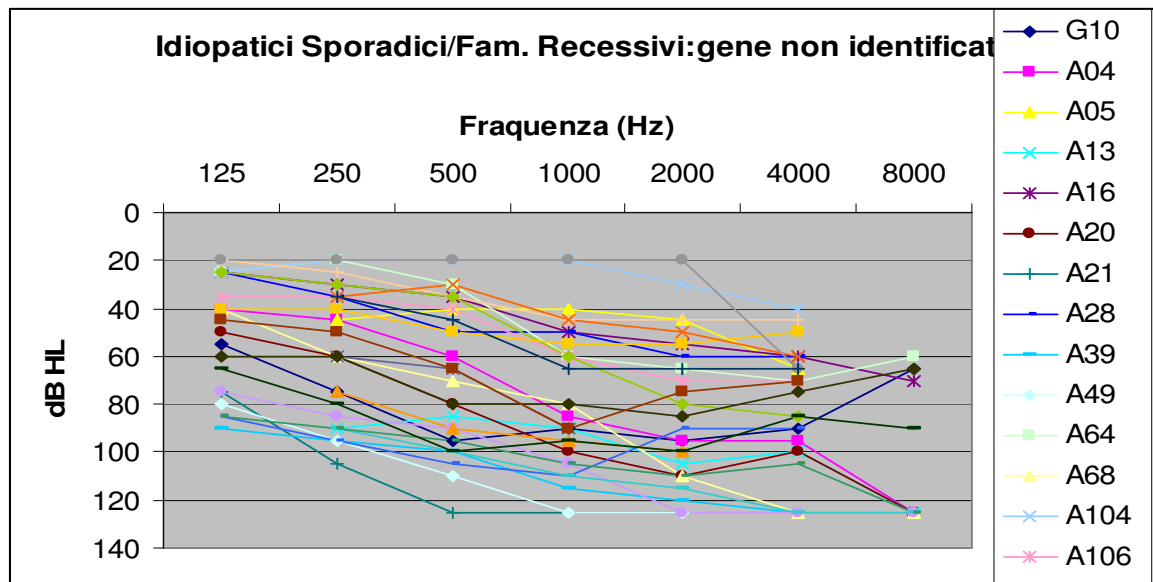


Fig. 11. Curve audiometriche nei soggetti idiomatici sporadici e familiari recessivi per cui non è stato identificato il gene.

Le perdite uditive di tali soggetti, al contrario di quanto mostrato nella Figura 6, in cui erano riportate quelle dei soggetti omozigoti 35delG, mostrano una grande variabilità riguardo al tipo di ipoacusia (da lieve a profondo).

Individuazione di una famiglia con mutazione di GJB2 a trasmissione autosomica dominante

La nostra attenzione si è soffermata inoltre sull'unica famiglia in cui la trasmissione era autosomica dominante; sono stati valutati con le indagini audiologiche descritte e con analisi genetica fino ad ora sette soggetti, di età compresa tra i 16 ed i 53 anni (fig. 11).

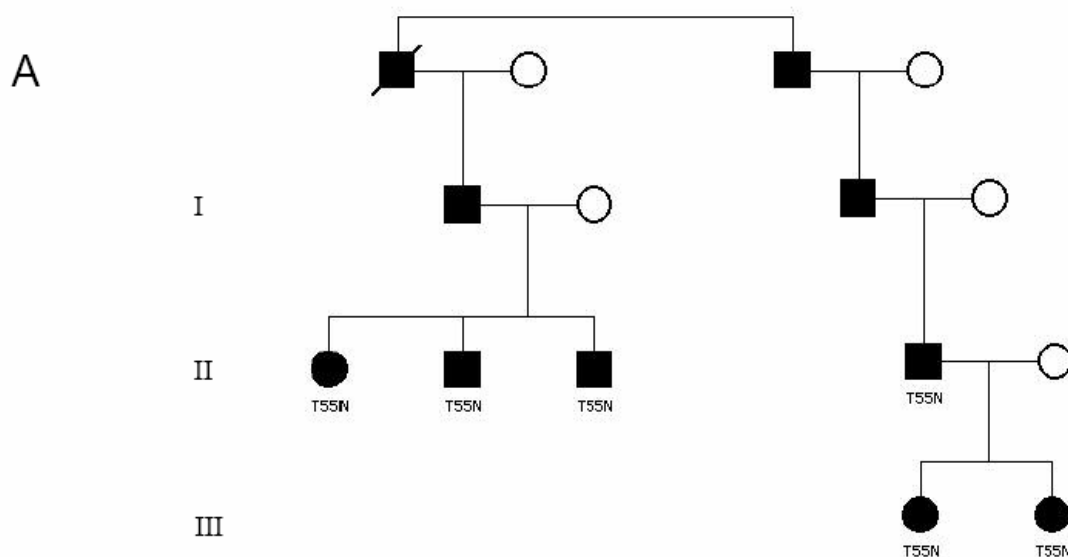


Fig. 11- Albero genealogico

I dati strumentali sono riassunti nella tab. 7 ; di particolare interesse è stato il rilievo di alterazioni vestibolari, finora mai riscontrate nei soggetti affetti da alterazioni della sintesi di connessina; in particolare:

- in sei pazienti (86%) erano presenti anomalie quali nistagmo verticale in basso (1soggetto), ipofunzione labirintica bilaterale in tre pazienti, ipofunzione labirintica monolaterale in due soggetti;
- i potenziali vestibolari hanno mostrato alterazioni nell'86% dei casi: erano assenti bilateralmente in un soggetto, vi era una differenza di ampiezza interaurale in tre soggetti ed in uno era presente una riduzione di ampiezza bilaterale.

Pz.	Età	Audiometria tonale	Ty Dx	Ty Sn	RS Dx	RS Sn	ABR	OAEs Dx	OAE Sn	Esame vestibolare	VEMPS Dx	VEMPS Sn
B.A.	53	Ipoacusia neuros. bilat.	Tipo A	Tipo A	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Ny verticale in basso	Pres con amp ridotta	Pres con amp ridotta
B.C.	47	Anacusia dx, ipoacusia neurosens sn	Tipo A	Tipo A	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Ipofunz labir.dx	Assenti	Assenti
B.V.	26	Ipoacusia neuros bilat	Tipo A	Tipo A	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Ipofunz.labir bilat, >sin	Presenti	Presenti
B.M.	24	Anacusia sn. Ipoacusia neurosens dx	Tipo A	Tipo A	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Preval labir dx	Pres con amp ridotta	Pres con amp ridotta
B.R.	20	Residui uditivi	Tipo A	Tipo A	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Normale	Presenti , ridotti, con differ interaurale	Presenti, ridotti, con differ interaurale
B.P.	16	Ipoacusia neuros. bilat	Tipo A	Tipo A	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Ipofunz labir bil	Presenti con differ interaurale	Presenti con differ interaurale
B.S.	14	Residui uditivi	Tipo A	Tipo A	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Ipofunz labir bil	Presenti con differ interaurale	Presenti con differ interaurale

Tab. 7 – indagini audio-vestibolari

In base all'indagine genetica tutti i soggetti sono risultati eterozigoti per una nuova mutazione del gene della connessina 26, dovuta ad una mutazione di una base (C→A) al nucleotide 164, risultante in una sostituzione della treonina con l' asparagina al codone 55 (mutazione T55N) (figura 12)

B

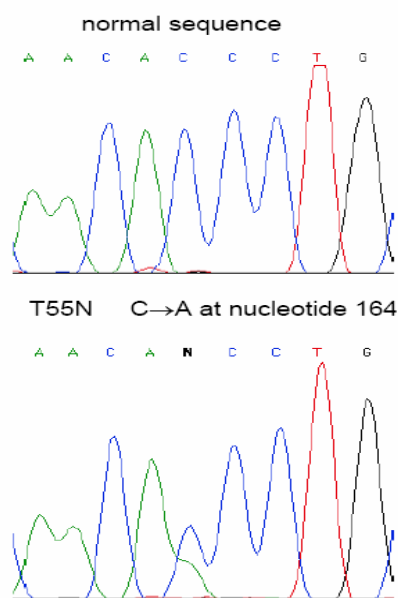


Fig. 12. Cromatogrammi indicanti la mutazione in soggetti sani (A) e malati (B).

Studi funzionali (esperimenti di transfezione cellulare) sembrano indicare che la proteina così mutata, sebbene espressa in quantità simili a quella del soggetto normale, difetti nel trafficking intracellulare e non riesca a raggiungere il suo sito sulla membrana (fig. 13).

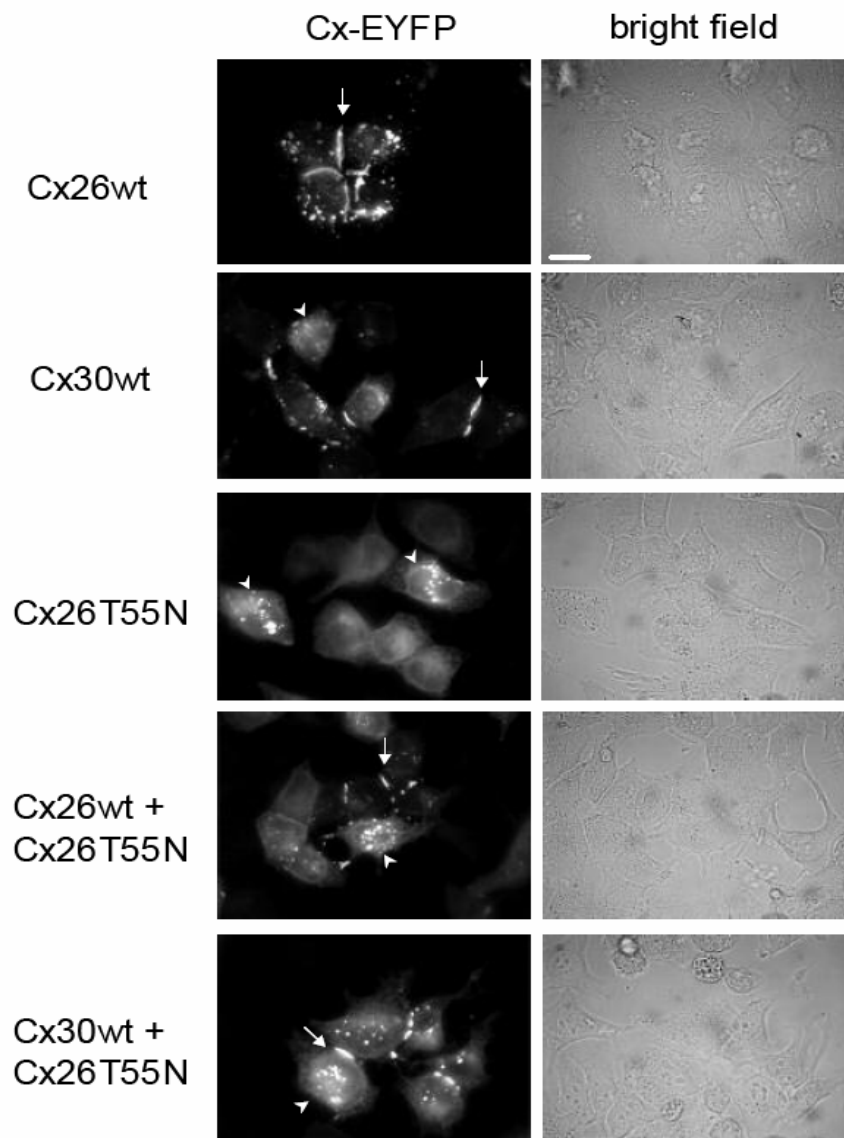


Fig. 13 Localizzazione della Cx26 wt e mutata a livello intracellulare

Individuazione di una famiglia portatrice di una mutazione del gene della *myoVIIA*

L'analisi dell'albero genealogico nella famiglia in esame ha evidenziato in tutti i soggetti affetti una trasmissione autosomica dominante (fig. 14)

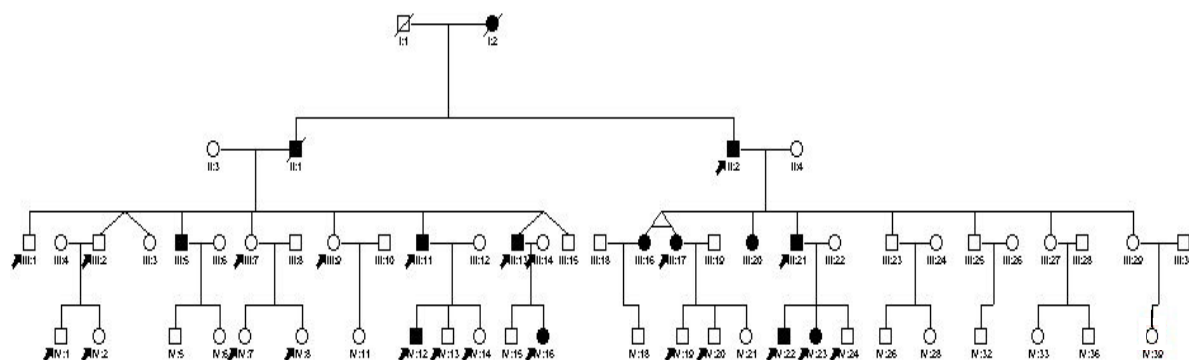


Fig. 14. Albero genealogico.

Le caratteristiche cliniche erano quelle di una sordità late onset (l'età media di insorgenza era di 6-7 anni) ma con costante progressione nel corso degli anni. L'entità dell'ipoacusia era, in media, di grado grave (fig. 15)

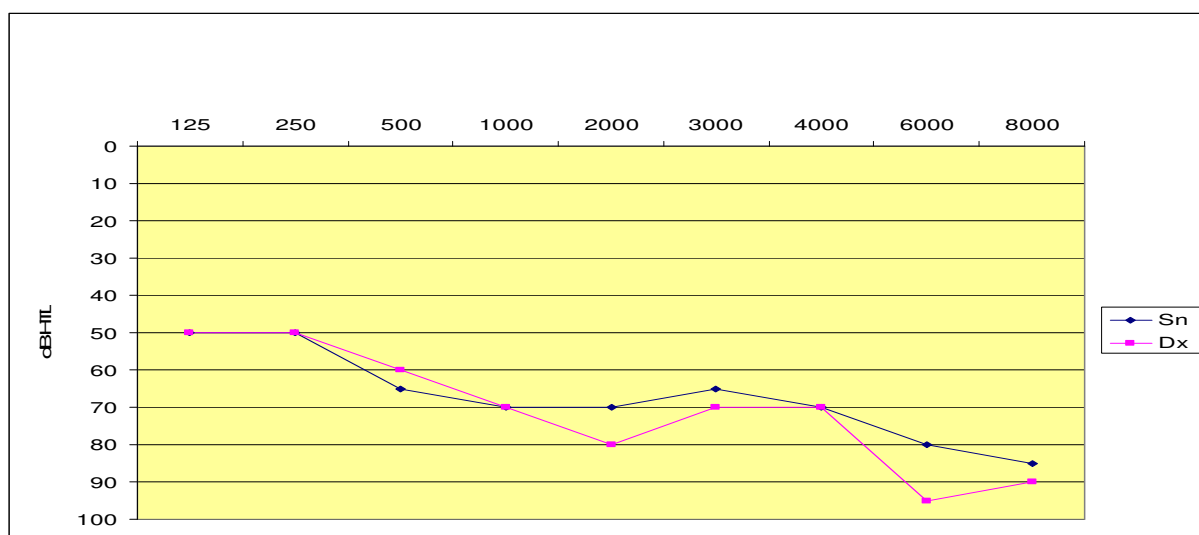


Fig. 15 - Audiogramma medio della famiglia in esame

L'analisi di linkage ha evidenziato un Lod Score statisticamente significativo (2.78) con il locus localizzato nella regione q13-q14 del cromosoma 11, che codifica per la miosina non convenzionale VIIA. In tale locus, nella famiglia oggetto dello studio, è stata riscontrata una nuova mutazione mai descritta finora: si tratta di una variazione nucleotidica che dà origine ad un cambiamento aminoacidico (Ala-Val) nella zona amino-terminale della proteina.

Individuazione di una famiglia portatrice di una mutazione mitocondriale

In un'altra famiglia la trasmissione mostrava i chiari aspetti di una trasmissione matrilineare, per cui è stata messa subito in evidenza una ereditarietà mitocondriale; allargando il numero di familiari esaminati, si è notato, però, che in alcuni componenti di tale famiglia era comunque presente una mutazione a carico di Cx26 che seguiva una modalità di trasmissione mendeliana classica (fig. 16 e tab. 8)

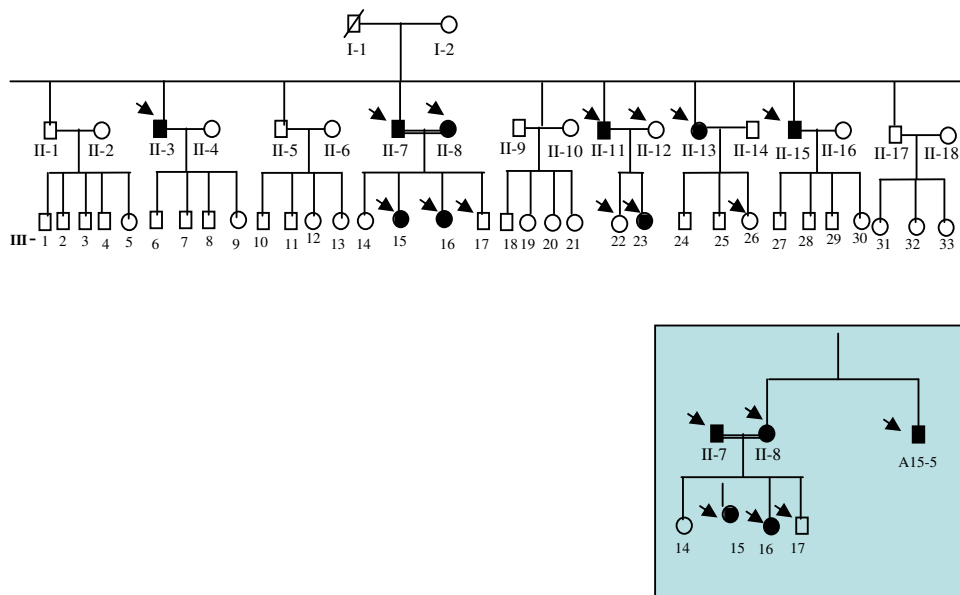


Fig. 16. Albero genealogico

	<i>Sigla</i>	<i>Cx26 (G296A)</i>	<i>mtDNA A1530G</i>	<i>Ipoacusia</i>	<i>Problemi vestibolari</i>
CL 61 aa	II-3	+	+	Perdita grave bilaterale da 2000 in su	Ipofunzione labirintica dx
CS 56 aa	II-7	-	+	Perdita da 2000 in poi	Nistagmo spontaneo diretto a dx. Ipofunzione sinistra
SD 46 aa	II-8	+	+	Perdita da 3000 in poi	Ipofunzione dx
SS 39 aa	A15-5	+	+	Perdita da 2000 in poi	Nistagmo spontaneo diretto a sx.
CA 48 aa	II-11	+	+	Perdita da 2000 in poi	Nella norma
VM 45 aa	II-12	-	-	Normoudente	Nella norma
CM 55 aa	II-13	+	+	<i>Dip monolaterale a 6-8 KHz</i>	<i>Ipofunzione labirintica sx</i>
CL 46 aa	II-15	+	+	Perdita sulle basse frequenze e da 2000 in poi	Nella norma
CA 31 aa	III/10	-	-	<i>Profondo dip monolaterale a 4 KHz</i>	<i>Nella norma</i>
CC 26 aa	III/12	+	-	Normoudente	Nistagmo spontaneo diretto a sx; Ipofunzione labirintica dx
CG 32 aa	III/14	NE	NE	<i>Normoudente Lievissimo dip monolaterale a 8 KHz</i>	<i>Nella norma</i>
CC 27 aa	III-15	+	+	<i>Dip a 6Khz, monolaterale</i>	<i>Nistagmo spontaneo diretto a sx; Ipofunzione destra</i>
CT 24 aa	III-16	+	+	Perdita da 1000 in poi, protesizzata	Nistagmo spontaneo diretto a dx. Ipofunzione sinistra
CA 21 aa	III-17	+	+	Normoudente	<i>Nistagmo spontaneo diretto a sx; Ipofunzione destra</i>
CG 24 aa	III/22	-	-	Normoudente	Ipofunzione labirintica sx
CA 22 aa	III-23	-	-	<i>Ipoacusia monolaterale profonda</i>	<i>Nella norma</i>
PN 25 aa	III/26	+	+	Normoudente	<i>Nella norma</i>

I soggetti II.7 e II-8 sono cugini: le mamme sono sorelle

Tab. 8 indagini audio-vestibolari.

Discussione e Conclusioni

La sordità è una patologia largamente diffusa nella popolazione. Attualmente però, per molti soggetti l'eziologia rimane sconosciuta; a tal fine, in questo lavoro di tesi sono stati analizzati soggetti prevalentemente di origine Campana. I soggetti sono stati analizzati da un punto di vista audiologico e genetico per la ricerca delle mutazioni nei geni attualmente identificati come i maggiori responsabili delle ipoacusie neurosensoriali non sindromiche. Il contributo del gene GJB2 nelle sordità neurosensoriali non sindromiche varia in diverse popolazioni e questa eterogenità genetica è enfatizzata anche dalla variazione della frequenza di specifiche mutazioni tra le diverse popolazioni.

La frequenza della mutazione 35delG dà conto di circa il 70% degli alleli mutati nel Nord-Sud Europa. La frequenza della 35delG è ancora più alta nei paesi vicino al Mediterraneo. Nei soggetti esaminati in questo studio la percentuale degli alleli mutati (35delG) risulta essere di circa 75% (60/80). Considerando solo i soggetti con origine Campana la percentuale è di 78 % (60/76). Per le altre mutazioni identificate nella zona codificante del gene GJB2, si può riscontrare che le mutazioni più frequenti sono la V153I (5 alleli) e la L90P (4 alleli).

I risultati ottenuti confermano l'importanza del gene GJB2 nella patogenesi delle sordità neurosensoriali. Nel campione Campano esaminato inoltre non sono state riscontrate mutazioni nel gene GJB6.

Per quanto, poi, riguarda la correlazione genotipo-fenotipo, diversamente da come riportato in letteratura ⁽⁴¹⁾ in cui si evidenzia una distribuzione bimodale (moderata e profonda) per le perdite uditive dei soggetti omozigoti, si può invece osservare che nel campione Campano esaminato la distribuzione degli esami audiometrici nei soggetti con omozigosi 35delG (Fig. 6) presenta perdite uditive prevalentemente profonde con una percentuale del 79% (19/24). Nei campioni idiopatici (Fig. 11) si osserva invece una distribuzione degli audiogrammi molto più ampia. Per le altre categorie non è possibile fare una chiara correlazione genotipo-fenotipo ad eccezione della conferma del dato che per quanto riguarda le ipoacusie a trasmissione autosomica dominante, le perdite uditive sono post-verbali e più lievi rispetto a quelle dei soggetti con mutazioni recessive.

Infine è da segnalare l'individuazione di tre famiglie in cui il carattere sordità veniva ereditato con modalità di trasmissione diverse; in particolare:

- famiglia 1: il gene GJB2 presentava una nuova mutazione T55N ereditata secondo una modalità autosomica dominante: nei membri di tale famiglia, inoltre, l'ipoacusia neurosensoriale profonda è accompagnata da anomalie della funzione vestibolare .

Questa nuova mutazione sembrerebbe determinare una alterazione della proteina tale da renderle difficile il raggiungimento del suo sito naturale di azione, ovvero la membrana cellulare;

- famiglia 2: è stata identificata una nuova variazione nucleotidica che dava origine ad un cambiamento aminoacidico (Ala-Val) nella zona amino-terminale della proteina: la mutazione da noi trovata non è ancora associata ad un modello molecolare per cui nel prossimo futuro la ricerca mirerà ad individuare il processo biochimico deficitario alla base del deficit funzionale della proteina nell'ambito della famiglia in esame.

Altri obiettivi rimangono da un lato la migliore conoscenza delle funzioni della miosina VIA nella fisio-patologia dell'audizione e dall'altro spiegare perché mutazioni a carico di un gene espresso non solo nell'orecchio ma anche in altri tessuti (retina, testicolo, polmone e rene) diano in realtà luogo solo a deficit uditivi (funzione vicariante da parte di altre proteine?);

- famiglia 3: l'esame dell'albero genealogico esprime chiaramente, soprattutto nella discendenza diretta di II-7 e II-8 (che sono, peraltro, tra loro cugini) una trasmissione della mutazione mitocondriale secondo classica linea matrilineare.

Come spesso accade, tuttavia, nelle ipoacusie a carattere genetico ad un particolare genotipo non corrisponde necessariamente lo stesso fenotipo, essendo quest'ultimo influenzato da quattro ordini di fattori:

- a) la contemporanea presenza di una mutazione a carico del gene della Cx 26 riscontrata, nel caso della famiglia oggetto di studio, oltre che in II-8 anche in altri discendenti maschi (ed in una donna) in seconda generazione. Tale mutazione, essendo a carico di un gene nucleare, segue una trasmissione mendeliana classica completamente differente dalla ereditarietà mitocondriale;
- b) le condizioni di omoplasma ovvero di eteroplasma della mutazione mitocondriale;
- c) l'età dei pazienti. E' verosimile, infatti, che soggetti giovani, pur essendo portatori di una o di entrambe le mutazioni, non abbiano ancora sviluppato

- un danno cocleare clinicamente evidenziabile ovvero di gravità paragonabile a quella di altri soggetti con lo stesso genotipo;
- d) fattori ambientali, come eventuali infezioni virali (da sospettare sempre soprattutto nelle forme monolaterali) ovvero l'impiego di antibiotici aminoglicosidi (peraltro non utilizzati dai membri della famiglia oggetto dello studio).

Bibliografia

1. **Toth T, Kupka S, Haack B et al.** *GJB2 mutations in patients with Non-Syndromic hearing loss from northeastern Hungary.* Human Mutat. Jun; 23(6):631-2, 2004
2. **Migliosi V:** Le ultime novità sulla genetica delle sordità. Comunicare.1, 31-35,2000
3. **Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA et al.** *Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg; 127: 1037-1042, 2001
4. **Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P.:** *Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans.* Hum Mol Genet. 1997 Sep;6(9):1605-9.
5. **Kelsell D.P, Dunlop J., Stevens H.P,et al:** *connexin 26 mutation in hereditary non-syndromic sensorineural deafness.* Nature, 1997, 387:80-83.
6. **Hsieh, C.-L., Kumar N.M.; Gilula, N.B., Francke U.:** *Distribution of genes for gap junction membrane channel proteins on human and mouse chromosomes.* Somat. Cell Molec. Genet. 17: 191-200, 1991.
7. **Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, Petit C.:** *A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q.* Nat Genet. 1994 Jan;6(1):24-8.
8. **Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S, Boulila-ElGaied A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El-Zir E, Aubeis A, Joannard A, Petit C, et al.:** *Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene.* Hum Mol Genet. 1997 Nov;6(12):2173-7.
9. **Marlin S, Garabédian EN, Roger G.** *Connexin 26 Gene Mutations in congenitally deaf Children.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 127:927-933,2001
10. **Forge A., Becker D.:** *Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assesment of connexin composition in mammals.* J Comp Neurol. 2003 Dec 8;467(2):207-31.
11. **Denoyelle F., Marlins S., Weil D., et al:** *Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implication for genetic counselling,* Lancet, 1999, 353: 1298-303.
12. **Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, Bruzzone R, Chaib H, Levi-Acobas F, Weil D, Petit C.** *Connexin 26 gene linked to a dominant deafness.* Nature. 1998 May 28;393(6683):319-20.
13. **Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D.** *A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: a novel founder mutation in Ashkenazi jews.* Hum Mutat 2001;18:460.
14. **del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F.** *A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment.* N Engl J Med 2002;346:243-9.
15. **del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, Cockburn DJ, Pandya A, Siemering KR, Chamberlin GP, Ballana E, Wuyts W, Maciel-Guerra AT, Alvarez A, Villamar M, Shohat M, Abeliovich D, Dahl HHM, Estivill X, Gasparini P, Hutchin T, Nance WE, Sartorato EL, Smith RJH, Van Camp G, Avraham KB, Petit C, Moreno F.** *Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing impaired subjects: a multicenter study.* Am J Hum Genet 2003;73:1452-8.
16. **Grifa A, Wagner C, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, Rabionet R, Arbones M, Della Monica M, Estivill X, Zelante L, Lang F, Gasparini P.** *Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus.* Nat Genet 1999;23:16-18.
17. **Pericak-Vance MA, Barker DF, Bergoffen JA, Chance P, Cochrane S, Dahl N, Exler MC, Fain PR, Fairweather ND, Fischbeck K, et al.:** *Consortium fine localization of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1): additional support that connexin32 is the defect in CMTX1.* Hum Hered. 1995 May-Jun;45(3):121-8.
18. **Xia JH, Liu CY, Tang BS, Pan Q, Huang L, Dai HP, Zhang BR, Xie W, Hu DX, Zheng D, Shi XL, Wang DA, Xia K, Yu KP, Liao XD, Feng Y, Yang YF, Xiao JY, Xie DH, Huang JZ.:** *Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment.* Nat Genet. 1998 Dec;20(4):370-3. Erratum in: Nat Genet 1999 Feb;21(2):241.

19. **Weil D, Kussel P, Blanchard S, Levy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H, Petit C.** *The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene.* Nat Genet 1997;16: 191-193.
20. **Weston MD, Kelley PM, Overbeck LD, Wagenaar M, Orten DJ, Hasson T, Chen ZY, Corey D, Mooseker M, Sumegi J, Remers C, Moller C, Jacobson SG, Gorin MB, Kimberling WJ.** *Myosin VIIA mutation screening in 189 Usher syndrome type 1 patients.* Am J Hum Genet 1996;59: 1074-1083.
21. **Liu XZ, Walsh J, Tamagawa Y, Kitamura K, Nishizawa M, Steel KP, Brown SDM.** *Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene.* Nature Genet 1997;17:268-269.
22. **Zina ZB, Masmoudi S, Ayadi H, Chaker F, Ghorbel AM, Drira M, Petit C.** *From DFNB2 to Usher Syndrome: variable expressivity of the same disease.* Am J Med Genet 2001;101: 181-183.
23. **Bolz H, Bolz SS, Schade G, Kothe C, Mohrmann G, Hess M, Gal A.** *Impaired Calmodulin binding of myosin-7A causes autosomal dominant hearing loss (DFNA1).* Hum mut (2004).
24. **Luijendijk MWJ, van Wijk E, Bischoff AMLC, Krieger E, Huygen PLM, Pennings RJE, Brunner HG, Cremers CWRJ, Cremers FPM, Kremer H.** *Identification and molecular modelling of a mutation in the motor head domain of myosin VIIA in a family with autosomal dominant hearing impairment (DFNA11).* Hum Genet 2004;115: 149-156.
25. **Karkos PD, Waldrom M, Johnson IJ.** *The MELAS syndrome. Review of the literature and role of the otologist.* Clin Otolaryngol, 2004, 29:1.4.
26. **Hirano M, Pavlakis SG.** *Mitochondrial myopat, encephalopathy, lactic acidosis and stroke episodes (MELAS): current concepts.* J. Chil Neurol, 1994,9:4-13.
27. **Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS et al.** *Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation.* Cell, 1990, 61:931-7.
28. **Lindsay JR, Hinojosa R.** *Histopathologic features of the inner ear associated with Kearn-Saayre syndrome.* Arch Otolaryngol, 1976,102: 747-752.
29. **Moraes CT, Dimauro S, Zeviani M et al.** *Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearn-Sayre syndrome: MRS study.* Younsei Med J, 2000,41:676-9.
30. **Van den Ouweland JMW, Lemkes HHPJ, Ruitenbeek W et al.** *Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type I diabetes mellitus and deafness.* Nature Genetica, 1992,1:368-371.
31. **Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G.** *Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non syndromic deafness associated with mitochondrial 12SrRNA mutation.* Hum Mol Gen, 1996, 5(7):963-971.
32. **Hutchin TP, Cortopassi GA.** *Mitochondrial defect and hearing loss.* Cell Mol Life Sci, 2000, 57(13-14):1927-37.
33. **Prezan T TR, Agapian JV, Bohlman MC et al.** *Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic induced and non syndromic deafness.* Nat Genet, 1993,4(3):289-294;
34. **Bacino CM, BuX, Fischel-Ghodsian N et al.** *Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene aminoglycoside induced deafness.* Pharmacogenetics, 1995,5:165-72.
35. **Yamasoba T, Goto Y, Oka Y et al.** *Atypical muscle pathology and a survey of cis-mutations in deaf patients harboring a 1555°-toG point mutation in the mitochondrial ribosomal RNA gene.* Neuromuscul Disord. 2002,12(5):506-12.
36. **Reid FM, Rovio A, Holt Ijet al.** *Molecular phenotype of a human lymphoblastoid cell-line homoplasmic for the np1445 deafness-associated mitochondrial mutation.* Human Molecular Genetics, 1997, 6(3):443-449.
37. **Jacobs HT.** *Mitochondrial deafness.* Ann Med 1997,29:483-491.
38. **Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT.** *A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness.* Hum Mut, 1994,3(3):243-7.
39. **Tiranti V, Chariot P, Carella F et al.** *Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA-ser(UCN) gene,* Hum Mol Genet, 1995,4:1421-27.
40. **Hutchin TP, Parker MJ, Mueller RF et al.** *Mitochondrial DANN mutations in the tRNA-ser(UCN) gene causing maternally inherited hearing impairment.* Am J Hum Genet, 1999,65:A275.
41. **Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F.:** *Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability.* J Med Genet. 1999 Nov;36(11):829-32.